

平衡透析法における誤差の原因

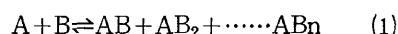
中 森 裕 子*

Sources of Error in Analytical Equilibrium Dialysis

Hiroko Nakamori

I 緒 言

多くの生理活性物質は生体高分子との相互反応を通じてその生理的機能を発現する。従って、高分子(A)と低分子リガンド(B)の相互反応の解析は生化学の分野においては最も基本的な作業の一つである。平衡透析法によって



(1)式の反応の結合パラメーターを測定する場合、原理的には図1に示すようにアクセプターAとリガンドBの溶液を半透膜で仕切り、Bのβ相における平衡濃度を測定することによって結合型Bの濃度を知ることになる。しかし、実際にはBのβ相における平衡濃度はAとの結合に一義的に依存するのではなく、Bの半透膜面への吸着や浸透圧による容積変化の影響を受ける。従来、操作と装置の簡便さのため、図2aに示すような方法¹⁾を取るものが多く、事実、学生実験においても同方法を採用して来た。しかし、特に学生実験のよ

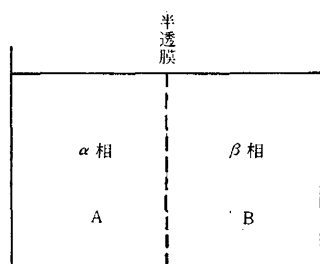


図1 平衡透析法

うに操作や条件を一定にすることが困難な場合、この方法による測定値は大きくばらつく。測定値の誤差の主要な原因は、①低分子リガンドBの膜面への吸着と②浸透圧によるα相の容積変化であろう。①の影響は半透膜と溶液との接触面を一定に保つことによって除

去されるが、従来の方法ではこの条件は満たされない。②の影響は、結合型のBの濃度またはα相の容積変化の度合を直接測定出来る場合は問題にならないが、一般に多成分系におけるこのような測定は容易ではない。浸透圧効果はα相とβ相の液面の高さをほぼ等しくすることによって測定誤差範囲内におさえることが出来るが、従来の方法では透析膜の両端を結ぶ時に内部の圧力がばらつき、誤差の原因になる。これらの誤差を除去するのにいくつかの手段が考えられるが、特に学生実験で要求される簡便さを考慮して、ここでは図2bに示すような方法を考案し、従来の方法と比較検討してみた。また、ここで使用したBSA—メチルオレンジの反応系は古くから研究されているが、結合様式については明らかにされていないので、合わせてここで検討したいと思う。

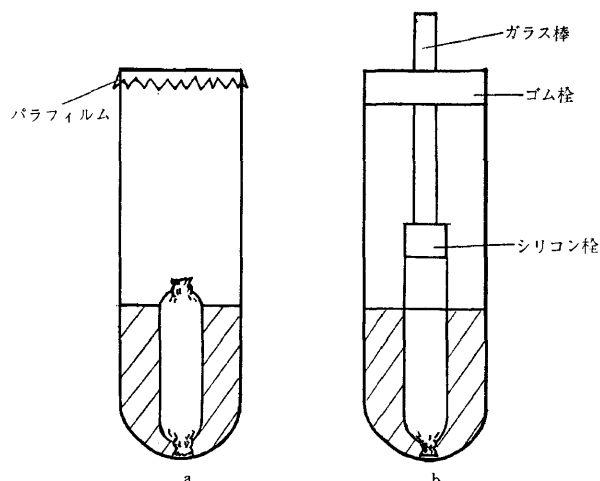


図2 平衡透析法 (a: 従来の方法 (方法I), b: 改良法 (方法II))

II 実験方法

1 試薬および反応溶液の調整

使用したBSA (2×Cryst.) はSigmaの製品で、メ

* 生物化学研究室

チルオレンジその他の試薬はすべて特級のものを使用した。

BSA (14μM) およびメチルオレンジ (20~200μM) は 0.02% 窒化ナトリウムを含む シェーレンセン のリン酸緩衝液 (M/15, pH 5.6) で調整した。Visking tube (20/32) は蒸留水で 4~5 時間煮沸した後、アルコールで充分洗い使用した。

2 操 作

①従来の方法 (以後, 方法 I と命名); BSA 溶液(A) 5 ml を Visking tube に取り, 予め 10ml のメチルオレンジ溶液(B)を入れた試験管 (A-21) に入れ, パラフィルム数枚で覆う (図 2a)。対照として BSA の代わりに 5 ml の緩衝液を用いて同じ操作を行なう。20, 25, 50, 100, 200μM の各濃度のメチルオレンジ溶液について, BSA と対照の組を用意する。

②改良法 (以後, 方法 II と命名); 予め 14cm に切り揃えた Visking tube に BSA 溶液(A) 5 ml を入れ, シリコン栓にはめて吊し, 予め上記の各濃度のメチルオレンジ溶液(B) 10ml を取った試験管 (A-24) に入れる。膜の内外の液面の高さがほぼ同じになるようにゴム栓とガラス棒で調節する (図 2b)。反応液を時々振盪しながら 5℃ (低温恒温水槽) または 35℃ (孵卵器) で 1 週間放置し, 平衡に達せしめる。膜の内部のメチルオレンジは遊離型または A と結合した形で存在するが, 平衡時における遊離型メチルオレンジの自由エネルギーは膜の内外で等しくなる。従って, 外液のリガンド濃度を 460nm での吸光度から測定することによって, B の遊離型および結合型の濃度を知ることが出来る。

3 結合パラメーターの測定

(1)式によって示される A の n ケの結合サイトへの B の結合が独立かつ同等であれば, 結合等温線は,

$$\theta = \frac{nkC_B}{1 + KC_B} \quad \text{又は} \quad \frac{1}{\theta} = \frac{1}{nKC_B} + \frac{1}{n} \quad (2)$$

によって与えられる。ここで θ は A 1 モル当りに結合している B のモル数で(3)式によって示される量であり, K は結合定数, \bar{C}_X および C_X (X=A または B) はそれ

$$\theta = \frac{\bar{C}_B - C_B}{\bar{C}_A} \quad (3)$$

ぞれ成分 X の全濃度 (M) および遊離型濃度を示す。実験的に θ を求めるには(4)式を適応すればよいが, リ

$$\theta = \frac{\bar{C}_B V_B - (V_A + V_B) C_B}{\bar{C}_A V_A} \quad (4)$$

ガンドの膜面への吸着に対する補正項を加えると(5)式が得られる。

$$\theta = \frac{(V_A + V_B)}{\bar{C}_A V_A} (C_B' - C_B) \quad (5)$$

ここで, V_A および V_B はそれぞれ膜の内部と外部の溶液の容積であり, C_B は外液中の B の濃度, C_B' は対照実験における外液の B の濃度を示す。K と n は θ と C_B を(2)式に従って逆数プロット ($\frac{1}{\theta}$ vs. $\frac{1}{C_B}$) して得られる直線の切点と勾配から計算される。しかし, もし A の n ケの結合サイトに対する B の結合が非協調的または協調的な場合には結合等温線は双曲線からずれ, 従って逆数プロットも直線にならない^{2,5)}。ここで使っている BSA - メチルオレンジの反応系は双曲線形の結合を示すので, n と K は逆数プロットから計算した。

BSA とメチルオレンジの結合の性質を調べるために, 反応の標準自由エネルギー変化 (ΔF°) を(6)式から求めた。エンタルピー変化 (ΔH°) が強い温度依

$$\Delta F^\circ = -RT \ln K \quad (6)$$

存性を示す場合には, (7)式を適応しなければならない

$$\Delta H^\circ = RT^2 \left[\frac{\partial (\ln K)}{\partial T} \right]_p \quad (7)$$

が, 測定温度が 5℃ と 35℃ の二点しかないため, ここでは(8)式によって示される条件を仮定して(9)式から概算した。

$$\left(\frac{\partial (\Delta H)}{\partial T} \right)_p = \Delta C_p = 0 \quad (8)$$

$$\ln \frac{K_1}{K_2} = -\frac{\Delta H^\circ}{R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right) \quad (9)$$

III 実 験 結 果

表 1 にはメチルオレンジの遊離型平衡濃度 (C_B) の測定値と θ^{-1} の計算値の一例を示してある。

表 1 5℃における結合データ

	$\bar{C}_A (\mu M)$	$\bar{C}_B (\mu M)$	$C_B (\mu M)$	$C_B' - C_B$	θ^{-1}	$C_B^{-1} (M^{-1})$
方 法 I	14	200	105.80	18.30	0.255	0.95×10^4
	"	100	49.30	10.95	0.426	2.02
	"	50	24.00	5.80	0.805	4.17
	"	25	11.30	3.56	1.311	8.85
	"	20	9.35	2.66	1.754	10.70
方 法 II	14	200	97.00	25.00	0.187	1.03×10^4
	"	100	45.75	14.30	0.326	2.19
	"	50	22.56	7.04	0.663	4.43
	"	25	10.88	4.00	1.167	9.19
	"	20	8.81	3.19	1.463	11.35

従来の方法 (方法Ⅰ) と改良法 (方法Ⅱ) による測定値のばらつきを比較するために逆数プロットを行なうと図3のようになる。最小二乗法によって求めた回帰

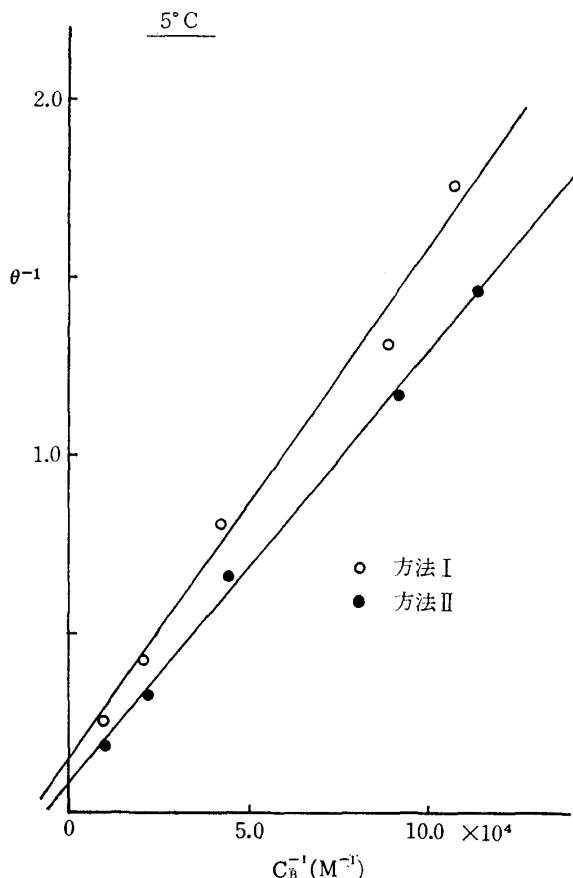


図3 BSA とメチルオレンジの結合等温線

直線の式はそれぞれ $\frac{1}{K} = 0.145 \frac{1}{C_B} + \frac{1}{7.3}$ (方法Ⅰ) および $\frac{1}{K} = 0.122 \frac{1}{C_B} + \frac{1}{13.3}$ (方法Ⅱ) で、 K および n の計算値に大きな差が出て来る。図2から明らかなように、方法Ⅱの測定値のばらつきは比較的小さい。事実、分散の推定値を概算すると、方法Ⅱでは5℃で0.03、35℃で0.06であるのに対し、方法Ⅰではそれぞれ0.08と0.10となる。この結果から、方法ⅡはⅠに比較してより正確な測定を与える結論としてよいであろう。方法Ⅱによって得た結合データをもとにBSAとメチルオレンジの結合パラメーターおよび熱力学的パラメーターを計算すると表2のようになる。

Ⅳ 考 察

限られたデータをもとに二つの方法を定量的に比較することは困難であるが、しかし、5℃と35℃における測定値の分散の比較や数回繰り返し行なった学生実験のための予備実験の結果を含めて総合すると、ここで考案した方法Ⅱがより正確な測定値を与えることは間違いない。おそらく従来の方法における測定誤差は先に予想した通り、リガンドの半透膜面への吸着と浸透圧による容積変化に対する補正の不正確さに起因するものと考えられる。改良法ではこれらの補正が容易であり、実験操作はむしろ簡単である。しかし、5℃と35℃における n のくい違い (表2) は改良法による測定値が必ずしも満足すべきものでないことを示している。BSAの高次構造が測定温度の範囲で大きく変化することは考えられず、従って BSA の最大結合サイト数 n の測定温度による相違は実験誤差とみなすべきであろう。方法Ⅰまたは方法Ⅱのいずれを採用する場合でも温度調節は測定の精度に左右する。特に平衡透析の容器として長い試験管を用いた場合にその上部が恒温の媒体 (水) からはみ出すため、試験管内に温度勾配が出来る。その結果、試験管壁に多量の水滴が付き外液が濃縮されることになる。

BSA とメチルオレンジの反応系は、① K と n が比較的大きく、②特別な定量操作を施さずにリガンドを比色定量出来る点で学生実験に適している。しかし、両成分の結合様式はまだ明らかにされていない。表2の ΔH° および ΔS° から定量的な結論を導き出すことは不可能であるが、エントロピーが大きく増加し、エンタルピー変化は小さいことから、この反応に疎水結合が関与していることは予想される。しかし、もし疎水結合が主な要因であるならば $\left(\frac{\partial(\Delta H)}{\partial T} \right)_p = 0$ は成立せず、従って ΔH° の計算に可成りの誤差が予想される。今後、この点を更に詳しく調べたいと考えている。

Ⅴ 要 約

従来の平衡透析法における測定誤差の原因を明らかにし、その改良法を考案した。従来の方法による測定

表2 結合の熱力学的パラメーター

T	K (M ⁻¹)	n (moles/mole)	ΔF° (kcal/mole)	ΔH° (kcal/mole)	ΔS° (e.u.)
278	6.2×10^3	13.3	-4.8	-0.85	14.3
308	5.3×10^3	9.0	-5.3	-0.85	14.3

誤差は、①低分子リガンドの透析膜面への吸着と②浸透圧による容積変化に対する補正の不正確さに基づく。改良法ではこれらの補正が容易であるばかりでなく、実験操作も極めて簡単である。

最後に、本実験にあたり御指導下さいました謝名堂教授に深く感謝致します。

参 考 文 献

1) Klotz, I. M., Walker, F. M., and Pivan, R. B., :

J. Am. Chem. Soc., **68**, 1486 (1946)

2) Scatchard, G., Schienberg, I. H., and Armstrong, S. H., : J. Am. Chem. Soc., **72**, 535 (1950)

3) Coryell, C. D. : J. Phys. Chem., **43**, 841 (1939)

4) Wyman, J., Jr. : Advance in Protein Chemistry, **19**, 223 (1964)

5) Monod, J., Wyman, J., Jr., and Changenx, J-P: J. Mol. Biol., **12**, 88 (1965)